

Vorrichtung und Verfahren zum Nachweis von Analyten durch Sichtbarmachung und Separation von Agglutination

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probenflüssigkeit durch Sichtbarmachung von Agglutinationsreaktionen, insbesondere Hämagglutinations- oder Partikelagglutinationsreaktionen.
- 10 Methoden zum Nachweis von Analyten durch Hämagglutinations- sowie Partikelagglutinationstests sind bekannt. Für Hämagglutinationstests sind Verfahren bekannt, bei denen Hämagglutinate durch einen Zentrifugationsschritt durch eine inerte Matrix von einzelnen nicht-agglutinierten Erythrozyten getrennt werden (z. B. EP-A-0194212, EP-A-0305337, EP-A-0485228, EP-A-0725276). Gemäss die-
- 15 sen Verfahren werden agglutinierte Erythrozyten auf oder in der inerten Matrix festgehalten und können damit von nicht-reagierenden einzelnen Erythrozyten getrennt werden, welche die Matrix durchdringen können und am Boden des Reaktionsgefäßes sedimentieren.
- 20 Die Trennmatrizes sind üblicherweise poröse Matrizes (beispielsweise aus Glas); Gelkugel-Matrizes (beispielsweise aus Sephadex, Sephacryl, Agarose: EP-A-0194212, EP-A-0305337) oder Glaskugel-Matrizes (EP-A-0725276).
- Allen diesen Systemen ist gemeinsam, dass die Trennmatrix und das Trägerele-
- 25 mentensystem zwei getrennte Komponenten umfassen. Dasselbe gilt für ebenfalls offenbarte Methoden, bei denen anstelle von Kügelchen poröse bzw. Filter-Matrizes verwendet werden. Das Trägerelementensystem wird jeweils mit herkömmlichen (Makro-) Spritzgussmethoden gefertigt.

Die genannten Matrices werden in der blutgruppenserologischen Diagnostik verwendet, insbesondere zur Sichtbarmachung von Hämagglutinationsreaktionen. Sie weisen allgemein Parameter nach, die besonders im Zusammenhang mit Transfusionen bzw. dem Morbus Hämolyticus Neonatorum von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich unter anderem um den Nachweis von Antigenen auf der Oberfläche der Erythrozyten, die für die Blutgruppen charakteristisch sind. Weitere wichtige Antigensysteme befinden sich auch auf Thrombozyten, Granulozyten, Lymphozyten, die ebenfalls bei Transfusion und/oder Transplantation eine Rolle spielen. Des weiteren können in ähnlicher Weise hämagglutinierende Viren nachgewiesen werden.

Die genannten Matrices, insbesondere Gelkugelmatrixes, werden ebenfalls für Partikelagglutinationstests eingesetzt. Bislang wird jedoch nur mit synthetischen Partikeln gearbeitet, die enge Spezifikationen erfüllen, insbesondere eine hohe spezifische Dichte und einen geringeren Durchmesser als Erythrozyten aufweisen (z.B. spezifische Dichte $\geq 1,1$; Durchmesser $< 5 \mu\text{m}$; vgl. EP-0849595).

Die bekannten Verfahren weisen eine Reihe von Nachteilen auf. Durch die Zentrifugation wird zwar eine räumliche Trennung von hämagglutinierten und einzelnen Erythrozyten erreicht, die Reaktionsmatrix für positive und negative Reaktionen umfasst jedoch ein einziges Kompartiment, so dass der Übergang von negativen (nicht-agglutiniert) zu positiven (agglutiniert) Reaktionen fließend ist und die Ergebnisauswertung damit einer gewissen Subjektivität unterliegt. Besonders bei schwach positiven Reaktionen kann die unscharfe Abgrenzung zu negativen Ergebnissen zu Interpretationsschwierigkeiten führen. Weiterhin hängt die Reproduzierbarkeit der bekannten Verfahren, die insbesondere mit Gelkugel-Matrix funktionieren, stark von der Qualität der Matrix, üblicherweise Polyacrylamid-Gelkügelchen, ab. Diese Gele weisen von einer Charge zur anderen Unterschiede auf, die bei gleicher Probe zu unterschiedlich starken Nachweisreaktionen führen können. Dies erschwert die Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Ergeb-

nisse. Die Empfindlichkeit der Gelpartikel gegenüber jeglicher Art von Scherkräften mit der Folge von insbesondere gebrochenen Gelpartikeln ist ein weiteres Problem, das zu verfälschten Reaktionen führen kann. Ferner ist allen hier erwähnten Matrices gemeinsam, dass sie dreidimensional sind und ein großer Bestandteil des Matrixraumes aus den Matrixpolymeren besteht, was dazu führt, dass ein Teil der farbigen Partikel, die in der Matrix eingeschlossen sind, für das bloße Auge verborgen bleiben, also nicht zur Detektion beitragen können. Weiterhin sind diese Verfahren für den Nachweis von Thrombozyteneigenschaften an intakten Thrombozyten wenig geeignet, da Thrombozyten das Gel nur schlecht passieren können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, die im Hinblick auf den Stand der Technik angeführten Nachteile, insbesondere die unscharfe Trennung des Nachweises von schwach positiven gegenüber negativen Reaktionen in den bekannten Matrices und die Lot-zu-Lot-Schwankungen in Gel-Matrices, zu überwinden, ohne dabei auf die Vorteile der Verfahren gemäss Stand der Technik, wie z. B. die mechanische Stabilität der in der Matrix festgehaltenen Agglutinate (stabiler Endpunkt) verzichten zu müssen. Insbesondere soll eine Trenn-Matrix in Abwesenheit von Gelpartikeln bereitgestellt werden, d. h. es soll ein Raum ohne Matrix im bekannten, engeren Sinne bereitgestellt werden, in dem die Bereiche für positive und negative Reaktionen ohne fließenden Übergang räumlich getrennt sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst zum einen durch eine Vorrichtung zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine oder mehrere Reaktionskammer/-kammern und/oder einen oder mehrere Reagenzapplikations-Kanal/-Kanäle und ein oder mehrere Kapillarsystem(e) und ein oder mehrere Negativ-Gefäß(e) umfasst.

Das Kapillarsystem der erfindungsgemäßen Vorrichtung, das sich vorzugsweise einer Reaktionskammer oder einem Reagenzapplikationskanal anschließt, ist inte-

graler Bestandteil eines Trägerelements, welches vorzugsweise aus synthetischen Materialien besteht, beispielsweise Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol, Topas oder Polymethylmetacrylat, und ist selbst Matrix-frei.

- 5 Ein Kapillarsystem umfasst mindestens eine Kapillare einer Kapillarebene oder eine oder mehrere Kapillaren, die in eine oder mehrere Kapillarebenen verzweigt oder verjüngt sind. Es umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung eine oder mehrere Kapillaren, die sich stufenweise in weitere Kapillarebenen verjüngen, die jeweils untereinander angeordnet sind, und sich am Ende in
10 einem Negativ-Gefäß sammeln. Das Kapillarsystem umfasst mindestens eine Kapillare einer Ebene, die in ein Negativ-Gefäß mündet. In einer Ausführungsform der Erfindung sind pro Kapillarebene mehrere Kapillaren nebeneinander oder gebündelt angeordnet. Vorzugsweise besitzen nebeneinander oder gebündelt angeordnete Kapillaren einer Kapillarebene die gleiche Durchtrittsfläche für die zu
15 testende Flüssigkeit. Die Durchtrittsfläche der Kapillare oder der Kapillaren einer Kapillarebenen wird um so kleiner, je weiter distal sie von der Reaktionskammer angeordnet sind.

- Eine Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfasst ein Kapillarsystem mit nur einer Kapillare einer Kapillarebene. Beispielhaft weist die Durchtrittsfläche einer Kapillare dabei weniger als $250.000 \mu\text{m}^2$ auf.
20

- In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Kapillarebenen des Kapillarsystems durch Kammern verbunden, deren Durchtrittsfläche vorzugsweise genauso groß ist, wie diejenige der Kapillare mit dem größten Durchmesser, wobei die
25 Kammern vorzugsweise der Entlüftung bzw. dem Druckausgleich dienen. In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weisen nebeneinander angeordnete Kapillaren einer Kapillarebene Verbindungsstege auf, durch die sie miteinander verbunden sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Kapillaren (sotern es sich um mehr als eine Kapillare handelt) der erfindungsgemäßen Vorrichtung in jeder Ebene parallel nebeneinander und nicht gebündelt angeordnet, wodurch die Farbe der Partikel optimal für die Detektion genutzt werden kann.

5

Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist vorzugsweise einen Reagenzapplikationskanal auf. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist der Reagenzapplikations-Kanal mit einem Reagenz, beispielhaft ein Puffer, Verstärkerlösungen, Antikörper, vorbefüllt. Beispielhaft weist
10 der Reagenzapplikationskanal das 1,2-fache Volumen im Vergleich zum Kapillarsystem plus Negativ-Gefäß auf.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist das Negativ-Gefäß eine nach unten sich verengende, schmaler werdende Form
15 auf, beispielhaft pfeilartig nach unten zugespitzt oder U-förmig. Es ist an seiner Oberseite vorzugsweise mindestens so breit wie die Breite der Summe der Kapillaren der untersten Kapillarebene. Die Oberseite des Negativ-Gefäßes verläuft im rechten Winkel oder in jedem anderen Winkel, insbesondere kleinerem Winkel zum Kapillarsystem. Das Negativ-Gefäß weist in einer Ausführungsform vor-
20 zugsweise ein größeres Volumen auf, als das Volumen des gepackten Sediments der eingesetzten Zellen oder Partikel. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Volumen des Negativ-Gefäßes mindestens 0,8 mal so groß wie das Volumen des gesamten Kapillarsystems.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform befindet sich am Negativ-Gefäß mindestens ein Entlüftungskanal, bevorzugt an der breitesten Stelle eines Negativ-Gefäßes, dessen Verbindung zur unteren Ebene des Kapillarsystems vorzugsweise breiter ist als die Breite der Summe der Kapillaren der untersten Kapillarebene, der vorzugsweise außerhalb des Kapillarsystems nach oben verläuft.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind mehrere erfindungsgemäße Vorrichtungen (Reaktoren), jeweils mindestens umfassend eine Reaktionskammer, und/oder einen Reagenzapplikations-Kanal und ein Kapillarsystem und ein Negativ-Gefäß, parallel nebeneinander in ein synthetisches Trägerelement zusammengefasst. Beispielsweise vorhandene Entlüftungskanäle führen durch das Trägerelement nach oben. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können Teilbereiche der Außenwand eines Reaktors, vorzugsweise im Bereich des Kapillarsystems als optische Linse ausgestaltet sein, die der Wand eines einzelnen Reaktors bzw. der gesamten erfindungsgemäßen Vorrichtung die Funktion einer Lupe verleiht, um die Ablesung schwacher Reaktionen zu erleichtern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung insbesondere in der blutgruppenserologischen Diagnostik, vorzugsweise zur Bestimmung von menschlichen und tierischen Blutgruppen, Antikörpern gegen Blutgruppen, zur Bestimmung von Thrombozytenmerkmalen und gegen Thrombozyten gerichteten Antikörpern, zur Bestimmung von Leukozytenmerkmalen und gegen Leukozyten gerichteten Antikörpern, zum Nachweis hämagglutinierender Viren, zum Nachweis von Antikörpern gegen Peptide, Proteine, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, Viren, Bakterien, Parasiten, zum Nachweis viraler, bakterieller und parasitärer und anderer Antigene und/oder zum Nachweis von Autoantikörpern und Antikörpern gegen Allergene.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probenflüssigkeit durch Sichtbarmachung von Agglutination, dadurch gekennzeichnet, dass man a) die Probenflüssigkeit mit einem Reagenz in Kontakt bringt, b) das Reaktionsgemisch dem Einwirken von Gravitation, insbesondere durch Zentrifugation oder Magnetismus aussetzt, wobei das Reaktionsgemisch das Kapillarsystem der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 passiert, an welches sich ein Negativ-Gefäß der Vorrichtung

nach einem der Ansprüche 1 bis 13 anschließt und c) die Reaktion zwischen dem Analyten und dem Reagenz bestimmt.

- In einer besonderen Ausführungsform wird während dem Verfahrensschritt b) das
- 5 Reaktionsgemisch mit einem weiteren Reagenz in Kontakt gebracht.

- In einer weiteren Ausführungsform ist die Reihenfolge der einzelnen Verfahrensschritte aus a) und b) untereinander vertauscht, insbesondere erfolgt das Inkontaktbringen der Probenflüssigkeit mit einem Reagenz erst während des Einwirkens von Gravitation oder Magnetismus. Vorzugsweise umfassen die Probenflüssigkeit und/oder das Reagenz einen oder mehrere Sorten von Partikeln.
- 10

- Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden als Partikel insbesondere Erythrozyten, Thrombozyten und/oder Leukozyten bzw. Teile davon eingesetzt oder beispielsweise ein breites Spektrum an synthetischen Partikeln unterschiedlicher Materialien und Dichten, vorzugsweise Polystyrol-Partikel, Polybromstyrol-, magnetische und paramagnetische Partikel, Melamin-, Gelatine-, polymerisierte Agarose, Polymethylmetacrylat- oder andere synthetische Partikel.
- 15

- 20 Eine positive Reaktion ist dadurch gekennzeichnet, dass Teile des Kapillarsystems nach Zentrifugation sichtbar gefärbt sind. Je weiter oben die Zellen hängen bleiben, desto stärker positiv ist die Reaktion. Die Reaktion wird vorzugsweise mit dem blossen Auge, mit optischen oder elektronischen Verfahren bestimmt.

- 25 In besonderen Ausführungsformen weisen die Partikel eine natürliche Färbung auf oder sind gefärbt bzw. farbmarkiert oder radio-, fluoreszenz- und/oder enzymmarkiert. In einer besonderen Ausführungsform werden Partikel zur Verstärkung der Reaktion mit proteolytischen Enzymen vorbehandelt.

- 30 Bevorzugte Reagenzien, beispielsweise zum Befüllen des Reagenzapplikationskanals, sind insbesondere formulierte Lösungen von monoklonalen, polyklonalen

oder rekombinanten Antikörpern bzw. Fragmente davon, die gegen Blutgruppenmerkmale gerichtet sind, anti-Humanglobulin Antikörper bzw. Fragmente davon alleine oder in Kombination mit anti-human Komplement Antikörpern bzw. Fragmenten davon und/oder Pufferlösungen oder Verstärkerlösungen, welche
5 keine Antikörper enthalten.

Ein weiteres bevorzugtes Reagenz umfasst anti-Humanglobulin Antikörper bzw. Fragmente davon alleine oder in Kombination mit anti-human Komplement Antikörpern bzw. Fragmenten davon, wobei die Dichte der Lösung beispielsweise
10 durch Zugabe von Glyzerin, einem Dextran, einem Polyethylenglycol oder anderen künstlichen oder natürlichen Polymeren erhöht wird. Die Erhöhung der Dichte dient dazu, eine Barriere zu schaffen, welche unter den Bedingungen der Zentrifugation Erythrozyten noch passieren lässt, während zellfreies Serum bzw. Plasma zurückgehalten werden. Auf diese Weise wird es möglich, partikelgebundene
15 IgG-Moleküle von nicht partikelgebundenen IgG-Molekülen zu separieren. Der Nachweis partikelgebundener IgG-Partikel findet beispielsweise durch Reaktion mit anti-Humanglobulin-Reagentien, die sich vorzugsweise in der verdichteten Lösung befinden, statt und wird durch Agglutination sichtbar gemacht. Damit dies möglich ist, darf das anti-Humanglobulin-Reagenz nicht vorab durch im Serum/Plasma befindliche und dort im Überschuss vorliegende unspezifische IgG
20 Moleküle neutralisiert werden. Mit diesem Vorgehen wird es möglich, einen indirekten anti-Humanglobulin-Test ohne Waschschrift durchzuführen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere zur Bestimmung von Blutgruppen, Antikörpern
25 gegen Blutgruppen, von Verträglichkeiten zwischen Blutkonserve und Empfänger, zur Bestimmung von Thrombozytenmerkmalen und gegen Thrombozyten gerichteten Antikörpern, zur Bestimmung von Leukozytenmerkmalen und gegen Leukozyten gerichteten Antikörpern, zum Nachweis hämagglutinierender Viren,
30 zum Nachweis von Antikörpern gegen Viren, Bakterien, Parasiten, zum Nachweis

viraler oder anderer Antigene oder zum Nachweis von Autoantikörpern oder Antikörpern gegen Allergene.

Im Folgenden wird die Erfindung durch Figuren und Beispiele näher erläutert,
5 ohne sie einzuschränken. Es zeigen:

Fig. 1 eine Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit mehreren
sich nebeneinander angeordneten Kapillaren in mehreren Kapillarebenen,
wobei die Durchmesser der einzelnen Kapillaren der höherliegenden E-
benen grösser sind als diejenigen der tieferliegenden Ebenen.
10

Fig. 2 eine Darstellung einer Seitenansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit mehreren Kapillarebenen.

15 Fig. 3a eine Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Kapillare einer Kapillarebene.

Fig. 3b eine Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer sich
verjüngenden Kapillare einer Kapillarebene.
20

Fig. 3c eine Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit drei Kapillarebenen mit jeweils einer Kapillare.

Fig. 3d eine Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit drei Kapillarebenen mit jeweils einer Kapillare, wobei zwei Kammern zwischengeschaltet sind.
25

Fig. 3e eine Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit 3 Kapillaren einer Kapillarebene.

30

Fig. 3f eine Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit 4 Kapillaren einer Kapillarebene mit Verbindungsstegen.

Fig. 3g eine Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung mit einer Kapillare einer Kapillarebene mit 2 Entlüftungskanälen aus dem Negativ-Gefäß.

Fig. 4 eine Darstellung mehrerer (sechs) erfindungsgemäßer Vorrichtungen (Reaktoren) in einer Karte mit je einem Entlüftungskanal und verschiedenen graduieren positiven und negativen Ergebnissen.

10

In Fig. 1 wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit dem Ansatz einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2) einem Kapillarsystem (3), bestehend aus mehreren sich verjüngenden Kapillarebenen (3a), wobei die Durchmesser der einzelnen Kapillaren der höherliegenden Ebenen grösser sind als diejenigen der tieferliegenden Ebenen, mit mehreren Kapillaren (3b), und einem Negativ-Gefäß (4) eingebettet im Trägerelement (5).

In Fig. 2 wird in Seitenansicht beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit einem Reagenzapplikations-Kanal (2) einem Kapillarsystem (3), bestehend aus mehreren Kapillarebenen (3a), wobei die Durchmesser der einzelnen Kapillaren der höherliegenden Ebenen grösser sind als diejenigen der tieferliegenden Ebenen, mit mehreren Kapillaren (3b), und einem Negativ-Gefäß (4) eingebettet im Trägerelement.

In Fig. 3a wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2), einem Kapillarsystem (3), bestehend aus einer Kapillare einer Kapillarebene, und einem Negativ-Gefäß (4) eingebettet im Trägerelement (5).

In Fig. 3b wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2), einem Kapillarsys-

tem (3), bestehend aus einer sich verjüngenden Kapillare einer Kapillarebene, und einem Negativ-Gefäß (4) eingebettet im Trägerelement (5).

In Fig. 3c wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2), einem Kapillarsystem (3), bestehend aus drei Kapillarebenen mit jeweils einer Kapillare, und einem Negativ-Gefäß (4) eingebettet im Trägerelement (5).

In Fig. 3d wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2) einem Kapillarsystem (3), bestehend aus einer drei Kapillarebenen mit jeweils einer Kapillare, die durch Kammern (7) getrennt sind, und einem Negativ-Gefäß (4) eingebettet im Trägerelement (5).

In Fig. 3e wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2) einem Kapillarsystem (3), bestehend aus drei Kapillaren (3b) in einer Kapillarebene (3a), und einem Negativ-Gefäß (4) eingebettet im Trägerelement (5).

In Fig. 3f wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2) einem Kapillarsystem (3), bestehend aus vier Kapillaren in einer Kapillarebene, die mit Verbindungsstegen (8) mit einander verbunden sind, und einem Negativ-Gefäß (4) eingebettet im Trägerelement (5).

25

In Fig. 3g wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Vorrichtung gezeigt mit einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2), einem Kapillarsystem (3), bestehend aus einer Kapillare einer Kapillarebene, und einem Negativ-Gefäß (4), von dem aus am oberen Rand zwei Entlüftungskanäle (6) nach oben führen, eingebettet im Trägerelement (5).

30

In Fig. 4 wird beispielhaft eine Karte mit sechs ertindungsgemäßen Vorrichtungen (Reaktoren) gezeigt, jeweils mit einer Reaktionskammer (1), einem Reagenzapplikations-Kanal (2) einem Kapillarsystem (3), bestehend aus mehreren Kapillarebenen mit mehreren Kapillaren, wobei die Durchmesser der einzelnen Kapillaren der höherliegenden Ebenen grösser sind als diejenigen der tieferliegenden Ebenen, und einem Negativ-Gefäß (4), von dem aus am oberen Rand ein Entlüftungskanal (6) nach oben führt, eingebettet im Trägerelement (5). Die einzelnen Reaktoren der Karte zeigen verschieden gradierte positive Ergebnisse im Kapillarsystem (3), nämlich eine stark positive Reaktion (9), eine positive Reaktion (10), eine schwächer positive Reaktion (11) und eine schwach positive Reaktion (12), und negative Reaktionen (13) im Negativ-Gefäß (4).

Beispiele

1. Blutgruppenbestimmung

- 15 a) Beide Reaktionspartner werden in das Reaktionsgefäß pipettiert.

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl eines Phosphatpuffers pipettiert. Es wird in einer ID-Centrifuge (Dia-Med) zentrifugiert (10 min, 85 g). 25 µl einer auf 0.8 % verdünnten Suspension von Blutgruppe A Zellen (ReverseCyte A1, Medion Diagnostics) werden in die Reaktionskammer pipettiert, gefolgt von 5 µl anti-A (BIRMA-1, Serologicals). Die Karte wird erneut in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: die Hämagglutinate werden im Kapillarsystem zurückgehalten. Das Negativgefäß bleibt frei von Zellen. Werden anstelle der ReverseCyte A1 Zellen ReverseCyte B Zellen verwendet, sammeln sich die Zellen nach der Zentrifugation sichtbar im unteren Bereich des Negativgefäßes.

b) Agglutinationsreagenz vorpipettiert

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl anti-A (BIRMA-1, Serologicals) pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). 25 µl einer auf 0.8 % verdünnten Suspension von Blutgruppe A Zellen (ReverseCyte A1, Medion Diagnostics) werden in die Reaktionskammer pipettiert. Die Karte wird erneut in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: die Hämagglutinate werden im Kapillarsystem zurückgehalten. Das Negativgefäß bleibt frei von Zellen. Werden anstelle der ReverseCyte A1 Zellen ReverseCyte B Zellen verwendet, sammeln sich die Zellen nach der Zentrifugation sichtbar im unteren Bereich des Negativgefäßes.

c) Agglutinationsreagenz vorpipettiert, Vollblut verdünnt in Bromelinreagenz

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl anti-A (BIRMA-1, Serologicals) pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). 50 µl einer Suspension anticoagulierten Vollbluts einer Person mit Blutgruppe A werden mit 500 µl eines Bromelin-Reagens (Diluent 1, DiaMed) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach werden 10 µl dieser Suspension in die Reaktionskammer pipettiert. Die Karte wird sofort in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: die Hämagglutinate werden im Kapillarsystem zurückgehalten. Das Negativgefäß bleibt frei von Zellen. Werden anstelle der Blutgruppe A Zellen Blutgruppe B Zellen verwendet, sammeln sich die Zellen nach der Zentrifugation sichtbar im unteren Bereich des Negativgefäßes.

- d) Agglutinationsreagenz vorpipettiert aber nicht vorzentrifugiert, Vollblut verdünnt in Bromelinreagenz

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl anti-A (BIRMA-1, Serologicals) pipettiert. 50 µl einer Suspension anticoagulierten Vollbluts einer Person mit Blutgruppe A werden mit 500 µl eines Bromelin-Reagens (Diluent 1, DiaMed) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach werden 10 µl dieser Suspension in die Reaktionskammer pipettiert. Die Karte wird sofort in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: die Hämagglutinate werden im Kapillarsystem zurückgehalten. Das Negativgefäß bleibt frei von Zellen. Werden anstelle der Blutgruppe A Zellen Blutgruppe B Zellen verwendet, sammeln sich die Zellen nach der Zentrifugation sichtbar im unteren Bereich des Negativgefäßes.

- e) Bestimmung schwacher Blutgruppenmerkmale im Antihumanglobulin-Test: Dweak

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl anti-IgG in PBS, pH 7.4, 10 % Glyzerin, pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). 50 µl einer Suspension anticoagulierten Vollbluts einer Person mit Blutgruppe D in schwacher Ausprägung (Dweak) werden mit 500 µl einer Verdünnungslösung (Diluent 2, DiaMed) gemischt. Von dieser Suspension werden 25 µl in die Reaktionskammer pipettiert, gefolgt von 25 µl eines kommerziellen IgG-anti-D Produkts (ESD-1, DiaMed). Es wird für 15 min bei 37 ° C inkubiert und in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Die Erythrozyten werden hämagglutiniert und die Hämagglutinate werden im Kapillarsystem zurückgehalten. Das Negativgefäß bleibt frei von Zellen. Werden anstelle der Blutgruppe D positiven Zellen Blutgruppe D negative Zellen verwendet, sammeln sich die Zellen nach der Zentrifugation sichtbar im unteren Bereich des Negativgefäßes.

2. Serumgegenprobe

In die Reagenz-Applikationskanäle eines Trägerelements werden 5 µl eines niederionischen Puffers (DiaMed, Diluent 2) pipettiert. Danach werden 10 µl je einer Suspension von A1, A2, B, O-Testzellen (DiaMed, ID-DiaCell AB0) in 4 verschiedene Reaktionskammern des Trägerelements pipettiert, darauf werden 10 µl des Plasmas einer zu testenden Person mit Blutgruppe A in die Reaktionskammer dazupipettiert und das Gemisch wird 10 Minuten bei Raumtemperatur (18 bis 25 ° C) inkubiert. Die Karte wird in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Die B-Zellen reagieren positiv, die Hämagglutinate werden im Kapillarsystem zurückgehalten. Das Negativgefäß dieses Reaktors bleibt frei von Zellen. Die drei anderen Zellen (A1, A2, O), die nicht mit den Isoagglutininen im verwendeten Plasma reagieren, sammeln sich nach der Zentrifugation sichtbar im unteren Bereich des Negativgefäßes.

15

3. Antikörpersuch-Tests

a) Indirekter Antihumanglobulin Test (Indirekter Coombs-Test)

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl eines Gemischs aus anti-IgG und anti-C3d (Medion Diagnostics), das mit 10 % Glycerin (w/v) verdichtet wurde, pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). 25 µl einer Blutgruppe O Testzelle für den Antikörper-Suchtest (ScreenCyte 0.8 % I, II, III, Medion Diagnostics) werden in die Reaktionskammer pipettiert, gefolgt von 25 µl Patientenserum. Es wird für 15 min bei 37 ° C inkubiert und in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Enthält das Patientenserum einen irregulären Antikörper, der gegen ein auf einer der Zellen vorhandenes Antigen gerichtet ist, dann werden die Erythrozyten der entsprechenden Testzellen hämagglutiniert und die Hämagglutinate im Kapillarsystem zurückgehalten. Enthält das Patientenserum keinen irregulären Antikör-

25

per, der gegen ein auf einer der Zellen vorhandenes Antigen gerichtet ist, dann werden die Erythrozyten nicht hämagglutiniert. Sie sammeln sich nach der Zentrifugation als sichtbarer roter „Knopf“ im unteren Bereich des Negativgefäßes.

5

b) Enzym-Test

i) Einphasen-Test

10 In die Reagenz-Applikationskanäle eines Trägerelements werden 5 µl eines Phosphatpuffers, pH 7.4, pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). 25 µl einer Blutgruppe O Testzelle für den Antikörper-Suchtest (Screencyte I, II, III) werden in die Reaktionskammer pipettiert, gefolgt von 25 µl eines Enzym-Reagens (Diluent 1, DiaMed) und 25 µl Patientenserum. Es wird für 15 min bei 37 ° C inkubiert und in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Enthält das Patientenserum einen irregulären Antikörper, der gegen ein auf einer der Zellen vorhandenes Antigen gerichtet ist, dann werden die Erythrozyten der entsprechenden Testzellen hämagglutiniert und die Hämagglutinate im Kapillarsystem zurückgehalten. Enthält das Patientenserum keinen irregulären Antikörper, 20 der gegen ein auf einer der Zellen vorhandenes Antigen gerichtet ist, dann werden die Erythrozyten nicht hämagglutiniert. Sie sammeln sich nach der Zentrifugation als sichtbarer roter „Knopf“ im unteren Bereich des Negativgefäßes.

25

ii) Zweiphasen-Test

In die Reagenz-Applikationskanäle eines Trägerelements werden 5 µl eines Phosphatpuffers, pH 7.4, pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). 25 µl einer papainisierten Blutgruppe O Testzelle für den Antikörper-Suchtest (ID-DiaCell IP,

IIP, IIP, DiaMed) werden in die Reaktionskammer pipettiert, gefolgt von 25 µl Patientenserum. Es wird für 15 min bei 37 ° C inkubiert und in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Enthält das Patientenserum einen irregulären Antikörper, der gegen ein auf einer der Zellen vorhandenes Antigen gerichtet ist, dann werden die Erythrozyten der entsprechenden Testzellen hämagglutiniert und die Hämagglutinate im Kapillarsystem zurückgehalten. Enthält das Patientenserum keinen irregulären Antikörper, der gegen ein auf einer der Zellen vorhandenes Antigen gerichtet ist, dann werden die Erythrozyten nicht hämagglutiniert. Sie sammeln sich nach der Zentrifugation als sichtbarer roter „Knopf“ im unteren Bereich des Negativgefäßes.

c) Verträglichkeitstest (Kreuzprobe)

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl eines Gemischs aus anti-IgG und anti-C3d (Medion Diagnostics), das mit 10 % Glycerin (w/v) verdichtet wurde, pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). Das Blut einer Konserve wird verdünnt, indem 10 µl Zellsediment mit 1 mL einer Verdünnungslösung (Diluent 2, DiaMed) gemischt werden. Darauf werden 25 µl des verdünnten Konservenbluts in die Reaktionskammer pipettiert, gefolgt von 25 µl Patientenserum. Es wird für 15 min bei 37 ° C inkubiert und in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Enthält das Patientenserum einen Antikörper, der gegen ein Antigen der Erythrozyten des Konservenblutes gerichtet ist, dann werden diese hämagglutiniert und die Hämagglutinate im Kapillarsystem zurückgehalten (Spender und Empfänger inkompatibel). Enthält das Patientenserum keinen unverträglichen Antikörper, sammeln sich die Erythrozyten nach der Zentrifugation als sichtbarer roter „Knopf“ im unteren Bereich des Negativgefäßes.

4. Direkter Antihumanglobulin-Test (Direkter Coombs-Test)

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl eines Gemischs aus anti-IgG und anti-C3d (Medion Diagnostics), das mit 10 % Glyzerin (w/v) verdichtet wurde, pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). 10 µl einer mit IgG beladenen Coombs-Kontrollzelle (Coombs Control, Medion Diagnostics) werden in die Reaktionskammer pipettiert. Es wird sofort in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Da die Coombs Kontrollzelle mit IgG Antikörpern beladen ist, werden die Erythrozyten hämagglutiniert und die Hämagglutinate im Kapillarsystem zurückgehalten. Nicht IgG-beladene Zellen sammeln sich nach der Zentrifugation als sichtbarer roter „Knopf“ im unteren Bereich des Negativgefäßes.

5. Partikel-Agglutination mit Zentrifugation: Nachweis von Antikörpern gegen *T. pallidum*

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl eines anti-human IgG (Medion Diagnostics), das mit 10 % Glyzerin (w/v) verdichtet wurde, pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). Ein mit rekombinanten *T. pallidum* Antigenen (TpN15, TpN 17, TpN 47) beschichtetes Partikel-Reagenz (DiaMed, Syphilis polymer particles) wird während 5 sec auf höchster Stufe gevortext. Dann werden 5 µl eines Patientenserums sowie 25 µl des Partikel-Reagenz in die Reaktionskammer pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Patientenseren, welche Antikörper gegen eines oder mehrere der Syphilisantigene auf den Partikeln enthalten, agglutinieren die Partikel, so dass sie in ähnlicher Weise wie Erythrozyten im Kapillarsystem zurückgehalten werden. Seren von nicht infizierten Personen agglutinieren die Partikel nicht. Dadurch sedimentieren die freien Partikel während der Zentrifugation als sichtbarer bräunlicher „Knopf“ in den unteren Bereich des Negativgefäßes.

6. Partikel-Agglutination mit magnetischer Separation: Nachweis von Antikörpern gegen *T. pallidum*

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl eines
5 anti-human IgG (Medion Diagnostics), das mit 10 % Glyzerin (w/v) verdichtet wurde, pipettiert. Die Karte wird in einer ID-Centrifuge zentrifugiert (10 min, 85 g). Mit rekombinanten *T. pallidum* Antigenen (TpN15, TpN 17, TpN 47) beschichtete Paramagnetische Partikel (estapor microspheres, Frankreich) werden während 5 sec auf höchster Stufe gevortext. Dann werden 5 µl eines
10 Patientensерums sowie 25 µl des Partikel-Reagenz in die Reaktionskammer pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wird ein Magnet (LifeSep 1.5 S Magnetic Separation Unit, Dexter Magnetic Technologies, USA) an die Basis des Negativgefäßes gehalten. Ergebnis: Patientensерen, welche Antikörper gegen eines oder mehrere der Syphilisantigene auf den Partikeln
15 enthalten, agglutinieren die Partikel, so dass sie in ähnlicher Weise wie Erythrozyten im Kapillarsystem zurückgehalten werden. Seren von nicht infizierten Personen agglutinieren die Partikel nicht. Dadurch sedimentieren die freien Partikel als sichtbarer bräunlicher „Knopf“ in den unteren Bereich des Negativgefäßes.

20

7. Bestimmung von Humanem Parvovirus B19 Antigen

In einen Reagenz-Applikationskanal eines Trägerelements werden 5 µl eines PBS-Puffers, der auf pH 5.8 titriert wurde, pipettiert. Danach werden 10 µl einer Suspension papainisierter Testzellen, die das Blutgruppenantigen P tragen in die Reaktionskammer pipettiert, darauf werden 10 µl einer Lösung von
25 rekombinanten VP2 Partikeln in die Reaktionskammer dazupipettiert und das Gemisch sofort in der ID-Centrifuge zentrifugiert. Ergebnis: Die Zellen werden hämagglutiniert, die Hämagglutinate werden im Kapillarsystem zurückgehalten. Das Negativgefäß dieses Reaktors bleibt frei von Zellen. Wird an-

stelle der VP2 Partikel das Serum einer nicht viramischen Person eingesetzt, sammeln sich die Erythrozyten nach der Zentrifugation sichtbar im unteren Bereich des Negativgefäßes.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine oder mehrere Reaktionskammer/
5 -kammern (1), und/oder einen oder mehrere Reagenzapplikations-Kanal/
-Kanäle (2), und ein oder mehrere Kapillarsystem(e) (3) und ein oder mehrere
Negativ-Gefäß(e) (4) umfasst.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei ein Kapillarsystem (3) mindestens eine
10 Kapillare (3b) einer Kapillarebene (3a) umfasst oder eine oder mehrere Kapil-
laren (3b) umfasst, die in eine oder mehrere Kapillarebenen (3a) verjüngt sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Kapillarsystem (3) sich ver-
jüngenden Kapillarebenen (3a) umfasst, welche untereinander angeordnet
15 sind.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei in jeder Kapillarebene
(3b) mehrere Kapillaren (3b) nebeneinander angeordnet oder gebündelt sind.
- 20 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei nebeneinander oder
gebündelt angeordnete Kapillaren (3b) einer Kapillarebene (3a) Verbindungs-
stege (8) aufweisen.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei nebeneinander oder
25 gebündelt angeordnete Kapillaren (3b) einer Kapillarebene (3a) die gleiche
Durchtrittsfläche besitzen.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Durchtrittsfläche
der Kapillarebenen (3a) umso kleiner wird, je weiter distal sie von der Reakti-
30 onskammer (1) angeordnet sind.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Kapillarebenen (3a) des Kapillarsystems (3) durch Kammern verbunden sind, deren Durchtrittsfläche vorzugsweise genauso groß ist, wie diejenige der größten Kapillare (3b).
- 5 9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Reagenzapplikations-Kanal (2) das 1,2-fache Volumen im Vergleich zur Kapillare (3b) bzw. Kapillarsystem (3) plus Negativ-Gefäß (4) umfasst.
- 10 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Negativ-Gefäß (4) ein größeres Volumen aufweist, als das Volumen des gepackten Sediments der eingesetzten Zellen oder Partikel.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das Negativ-Gefäß (4) eine nach unten schmaler werdende Form, beispielhaft pfeilartig zugespitzt oder U-förmig, aufweist.
- 15 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, von der ein oder mehrere Entlüftungskanal/-kanäle (6), vorzugsweise vom oberen, breiteren Teil des Negativ-Gefäßes, abzweigt/abzweigen.
- 20 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Kapillarsystem (3) integraler Bestandteil des Trägerelements (5) ist.
14. Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten in einer Probenflüssigkeit durch Sichtbarmachung von Agglutination, dadurch gekennzeichnet, dass man
- 25 a) die Probenflüssigkeit mit einem Reagenz in Kontakt bringt,
- b) das Reaktionsgemisch dem Einwirken von Gravitation oder Magnetismus aussetzt, wobei das Reaktionsgemisch das Kapillarsystem der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 pas-
- 30

siert, an welches sich ein Negativ-Getaß der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 anschließt

und

c) die Reaktion zwischen dem Analyten und dem Reagenz bestimmt.

5

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei während des Verfahrensschritts b) das Reaktionsgemisch mit einem weiteren Reagenz in Kontakt gebracht wird.

10 16. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Reihenfolge der einzelnen Verfahrensschritte aus a) und b) untereinander vertauscht wird, insbesondere das Inkontaktbringen der Probenflüssigkeit mit einem Reagenz erst während dem Einwirken von Gravitation oder Magnetismus erfolgt.

15 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei die Probenflüssigkeit und/oder das Reagenz ein oder mehrere Partikel umfaßt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei die Reaktion optisch bestimmt wird.

20

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei die Partikel eine natürliche Färbung aufweisen oder gefärbt sind.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei die Partikel farb-, radio-, fluoreszenz- oder enzymmarkiert sind.

25

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 20, wobei die Partikel Erythrozyten und/oder Thrombozyten und/oder Leukozyten bzw. Teile davon umfassen.

30 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 21, wobei die Partikel zur Verstärkung der Reaktion mit proteolytischen Enzymen vorbehandelt werden.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 22, wobei Antikörper insbesondere gegen Peptide, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinsäuren, Viren, Bakterien, Parasiten, menschliche Zellen, tierische Zellen oder pflanzliche Zellen bzw. Teile davon an die Partikel gebunden sind.
5
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 23, wobei Antigene oder andere Liganden, wie z.B. Peptide, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinsäuren, Viren, Bakterien, Parasiten, menschliche Zellen, tierische Zellen, pflanzliche Zellen oder Allergene bzw. Teile davon an die Partikel gebunden sind.
10
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 24, wobei die Partikel insbesondere Polystyrol, Polybromstyrol, Gelatine, Melamin, polymerisierter Agarose oder Polymehtylmetacrylat umfassen.
15
26. Verfahren einem der Ansprüche 14 bis 25, wobei die Partikel magnetisch oder paramagnetisch sind.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 26, wobei die Probenmischung der Gravitation ausgesetzt wird, indem sie einer Zentrifugation unterworfen wird.
20
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 27, wobei die Probenmischung Magnetismus ausgesetzt wird.
25
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 28, wobei die Probenflüssigkeit menschliches, tierisches oder pflanzliches Material umfasst, insbesondere Blut oder Blutbestandteile.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 29, wobei das Reagenz insbesondere Antikörper, Testzellen, synthetische Partikel, Puffer oder Verstärkerlösungen, umfasst.
- 5 31. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 30, wobei dem Reagenz Glycerin oder andere Moleküle zur Erhöhung der spezifischen Dichte der Lösung zugefügt werden.
- 10 32. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 insbesondere in der blutgruppenserologischen Diagnostik, vorzugsweise zur Bestimmung von Blutgruppen, Antikörpern gegen Blutgruppenmerkmale, von Verträglichkeiten zwischen Blutkonserve und Empfänger, zur Bestimmung von Thrombozytenmerkmalen und gegen Thrombozyten gerichteten Antikörpern, zur Bestimmung von Leukozytenmerkmalen und gegen Leukozyten gerichteten Antikörpern, zum Nachweis hämagglutinierender Viren, zum Nachweis von Antikörpern gegen Proteine, Viren, Bakterien, Parasiten, zum Nachweis viraler oder bakterieller oder parasitärer oder anderer Antigene und/oder zum Nachweis von Autoantikörpern und gegen Allergene gerichteten Antikörpern.
- 15

FIG. 1

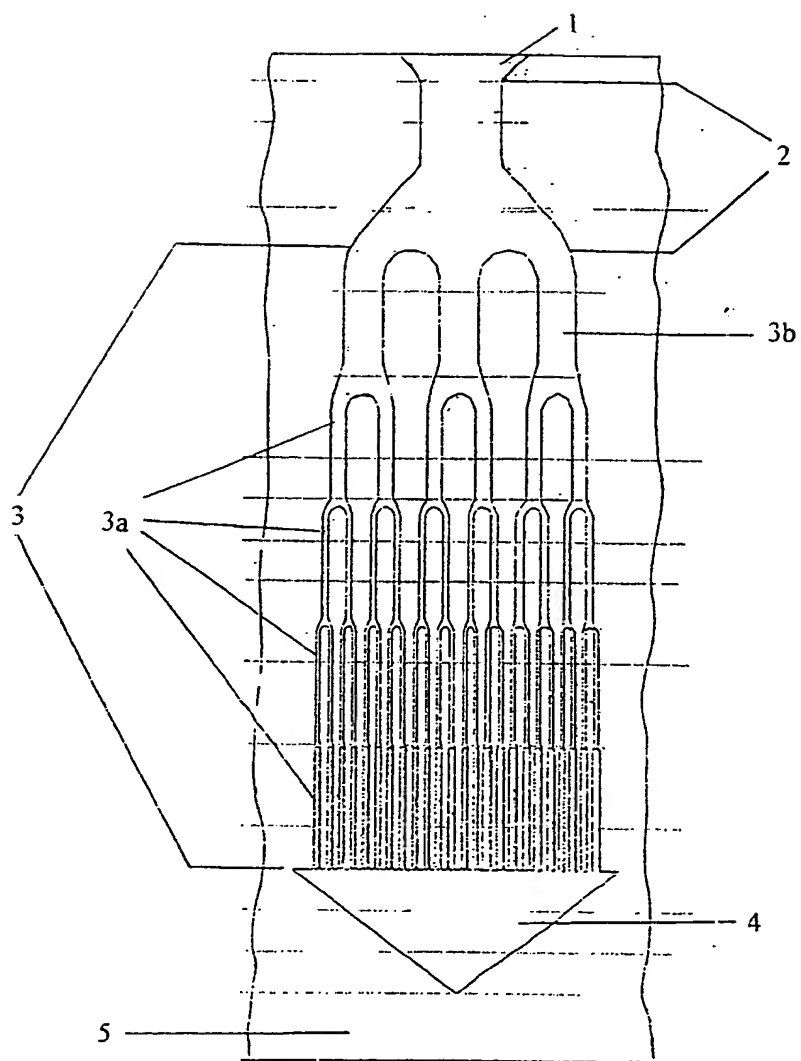
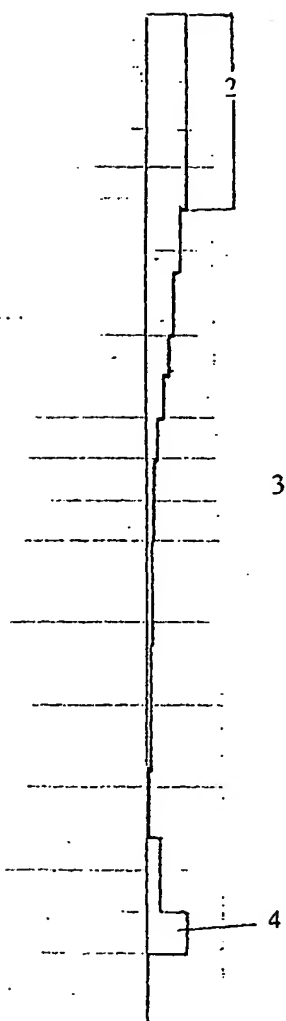


FIG. 2



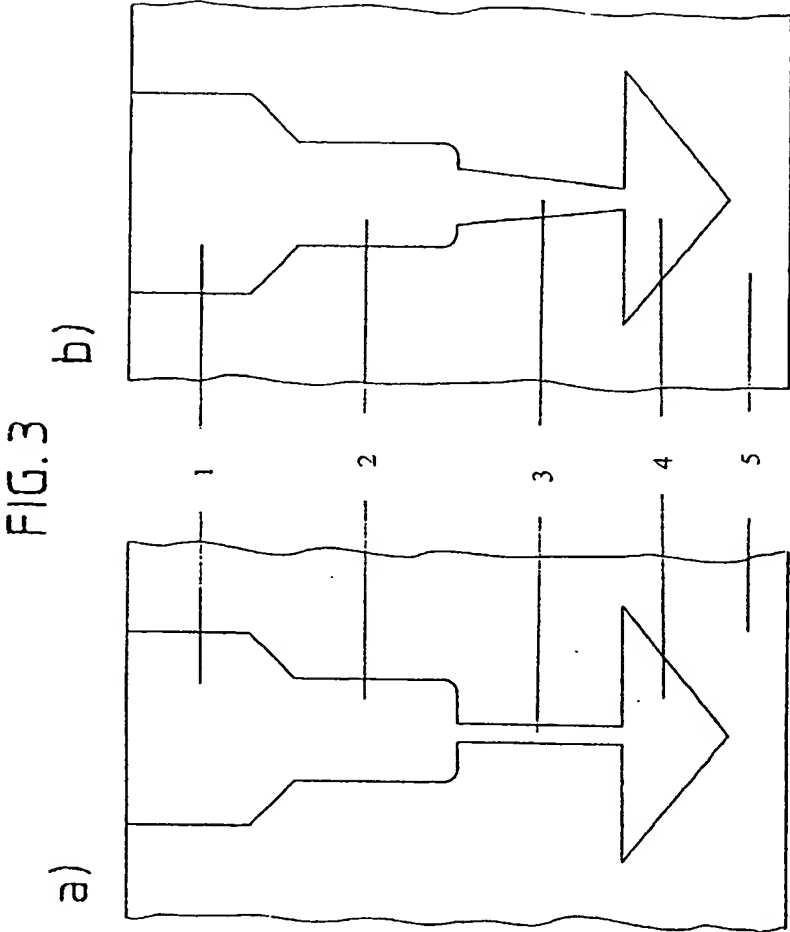


FIG. 3

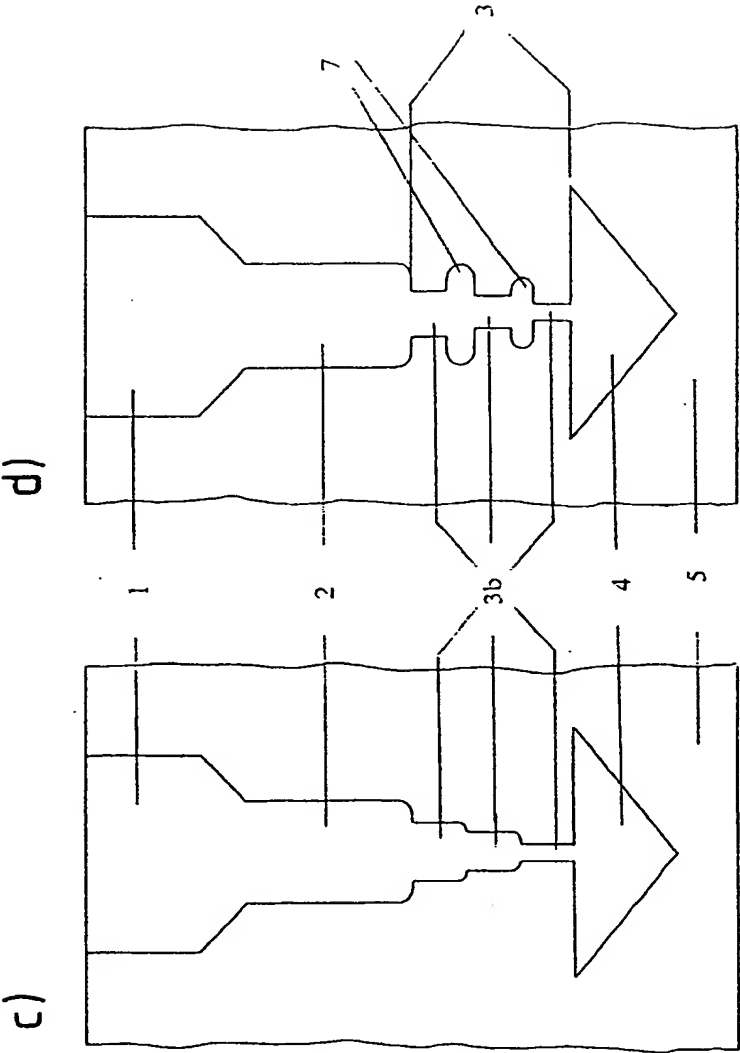


FIG. 3

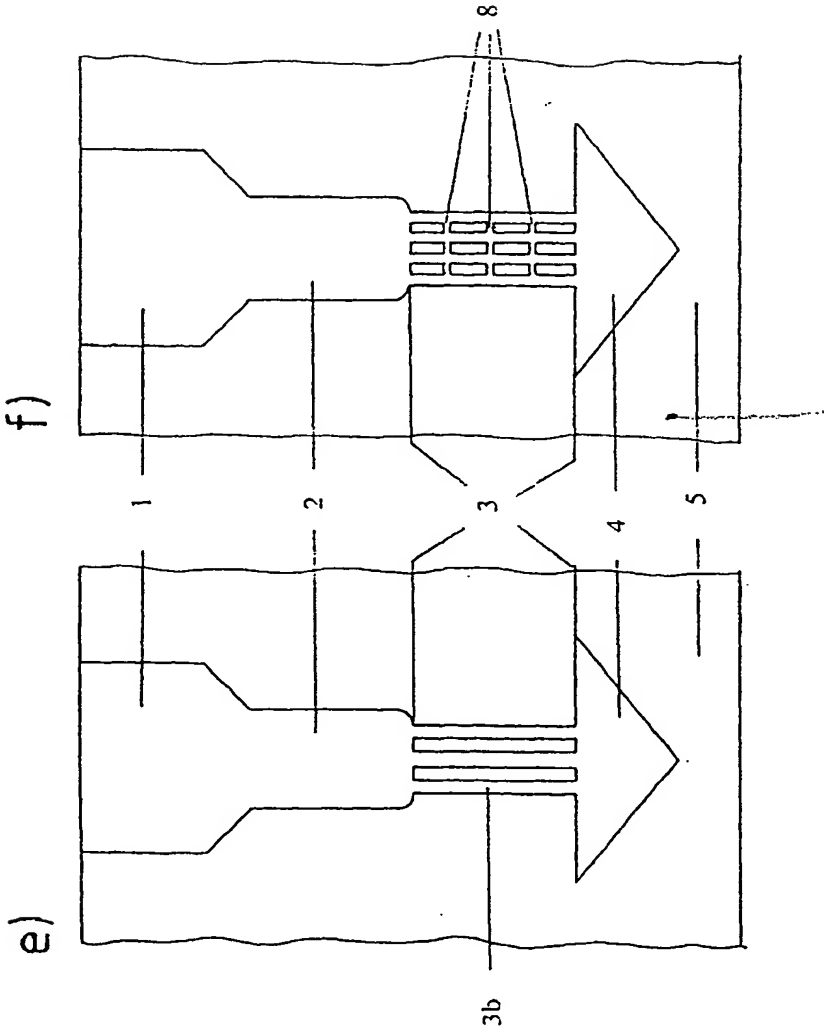


FIG. 3

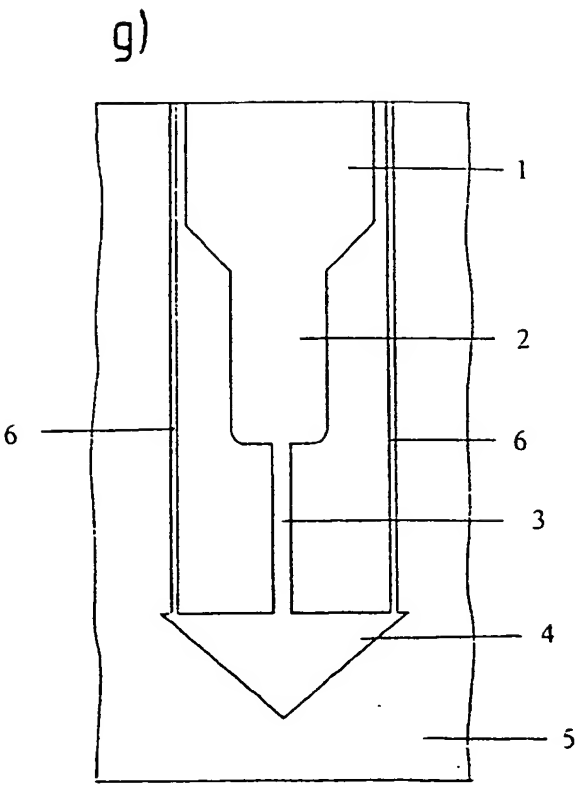
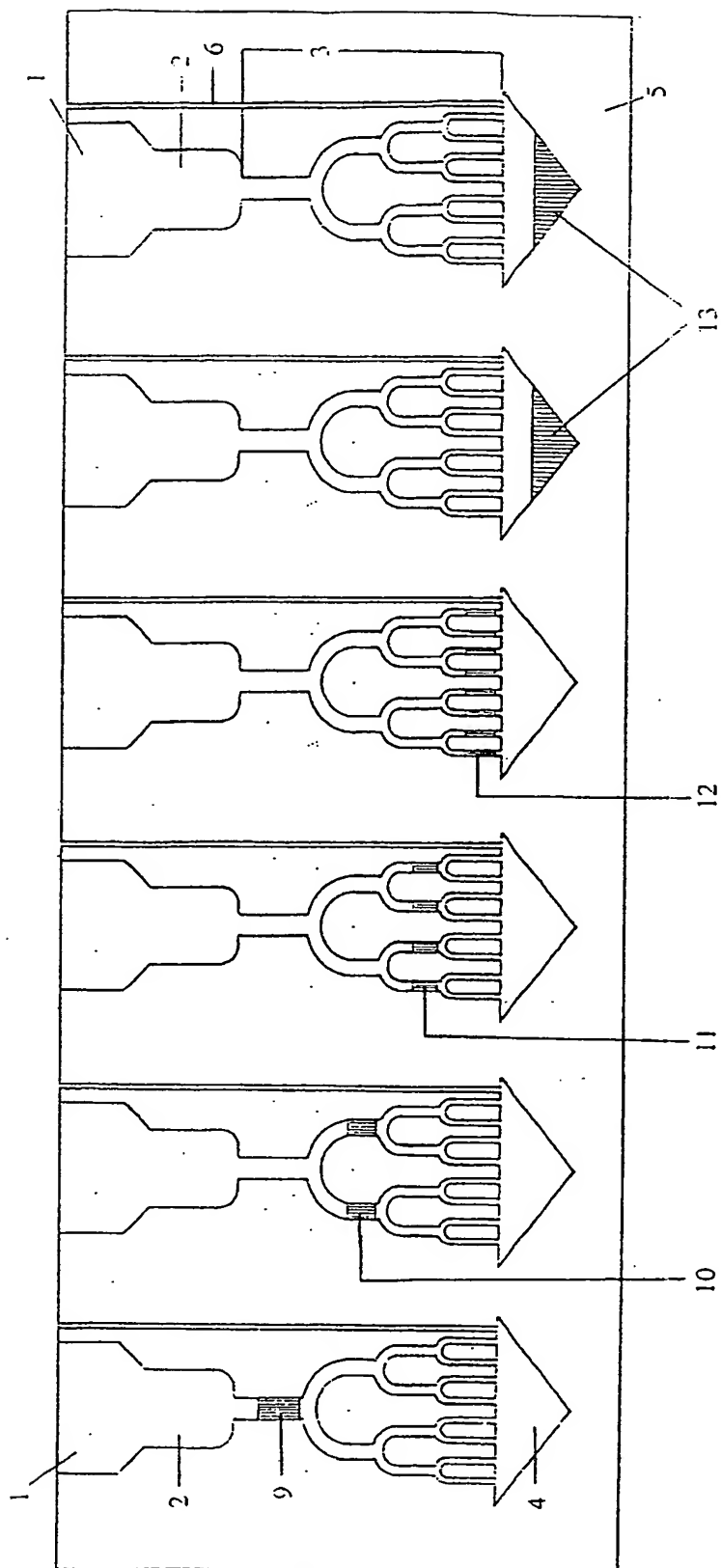


FIG. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/001029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/53 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/129671 A1 (WILDING PETER ET AL) 10 July 2003 (2003-07-10) paragraphs '0016!', '0045!', '0075!', '0079!; claim 1; figure 4	1
A	EP 0 485 228 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 13 May 1992 (1992-05-13) cited in the application page 3, line 53 - page 5, line 5	1-5, 14-16
A	EP 0 849 595 A (STIFTUNG FUER DIAGNOSTISCHE FORSCHUNG) 24 June 1998 (1998-06-24) page 5, line 13 - line 48	1, 14

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

'E' earlier document but published on or after the international filing date

'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 July 2005

Date of mailing of the international search report

12/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tragoustis, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2005/001029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003129671 A1	10-07-2003	US 6551841 B1	22-04-2003
		US 5866345 A	02-02-1999
		US 5637469 A	10-06-1997
		US 2005079634 A1	14-04-2005
		AT 155711 T	15-08-1997
		AT 167816 T	15-07-1998
		AT 140025 T	15-07-1996
		AT 140880 T	15-08-1996
		AT 174813 T	15-01-1999
		AU 677780 B2	08-05-1997
		AU 4222393 A	29-11-1993
		AU 680195 B2	24-07-1997
		AU 4222593 A	29-11-1993
		AU 677781 B2	08-05-1997
		AU 4222693 A	29-11-1993
		AU 4222793 A	29-11-1993
		AU 677197 B2	17-04-1997
		AU 4223593 A	29-11-1993
		CA 2134474 A1	11-11-1993
		CA 2134475 A1	11-11-1993
		CA 2134476 A1	11-11-1993
		CA 2134477 A1	11-11-1993
		CA 2134478 A1	11-11-1993
		DE 69303483 D1	08-08-1996
		DE 69303483 T2	06-02-1997
		DE 69303898 D1	05-09-1996
		DE 69303898 T2	20-02-1997
		DE 69312483 D1	04-09-1997
		DE 69312483 T2	12-02-1998
		DE 69319427 D1	06-08-1998
		DE 69319427 T2	10-12-1998
		DE 69322774 D1	04-02-1999
		DE 69322774 T2	17-06-1999
		EP 0637996 A1	15-02-1995
		EP 0637997 A1	15-02-1995
		EP 0639223 A1	22-02-1995
		EP 0637998 A1	15-02-1995
		EP 0637999 A1	15-02-1995
		ES 2106341 T3	01-11-1997
		ES 2127276 T3	16-04-1999
		GR 3025037 T3	30-01-1998
		GR 3029509 T3	28-05-1999
		HK 16897 A	13-02-1997
		HK 1001305 A1	16-11-2001
		JP 3298882 B2	08-07-2002
		JP 7506430 T	13-07-1995
		JP 7506431 T	13-07-1995
		JP 7506256 T	13-07-1995
		JP 3207424 B2	10-09-2001
		JP 7506257 T	13-07-1995
EP 0485228 A	13-05-1992	AT 142790 T	15-09-1996
		AT 176528 T	15-02-1999
		AT 203188 T	15-08-2001
		CA 2055095 A1	10-05-1992
		DE 69122036 D1	17-10-1996
		DE 69122036 T2	06-02-1997
		DE 69130876 D1	18-03-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/001029

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0485228	A	DE 69130876 T2	29-07-1999
		DE 69132666 D1	23-08-2001
		DE 69132666 T2	08-05-2002
		DK 485228 T3	30-09-1996
		DK 725276 T3	20-09-1999
		DK 755719 T3	24-09-2001
		EP 0485228 A1	13-05-1992
		EP 0725276 A1	07-08-1996
		EP 0755719 A2	29-01-1997
		ES 2094206 T3	16-01-1997
		ES 2126978 T3	01-04-1999
		ES 2159681 T3	16-10-2001
		GR 91100453 A ,B	08-10-1992
		JP 3299768 B2	08-07-2002
		JP 4285858 A	09-10-1992
EP 0849595	A	24-06-1998	EP 0849595 A1
			AT 201100 T
			AU 724475 B2
			AU 4690797 A
			BR 9705648 A
			CN 1191312 A ,C
			DE 59606885 D1
			DK 849595 T3
			ES 2156610 T3
			GR 3035882 T3
			HK 1008244 A1
			JP 10197534 A
			NO 975937 A
			PT 849595 T
			US 6203706 B1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001029

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/53 B01L3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N B01L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2003/129671 A1 (WILDING PETER ET AL) 10. Juli 2003 (2003-07-10) Absätze '0016!', '0045!', '0075!', '0079!; Anspruch 1; Abbildung 4 -----	1
A	EP 0 485 228 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 13. Mai 1992 (1992-05-13) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 53 - Seite 5, Zeile 5 -----	1-5, 14-16
A	EP 0 849 595 A (STIFTUNG FUER DIAGNOSTISCHE FORSCHUNG) 24. Juni 1998 (1998-06-24) Seite 5, Zeile 13 - Zeile 48 -----	1,14

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Juli 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/07/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Tragoustis, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Abkürzungszeichen

PCT/EP2005/001029

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2003129671 A1	10-07-2003	US 6551841 B1	22-04-2003
		US 5866345 A	02-02-1999
		US 5637469 A	10-06-1997
		US 2005079634 A1	14-04-2005
		AT 155711 T	15-08-1997
		AT 167816 T	15-07-1998
		AT 140025 T	15-07-1996
		AT 140880 T	15-08-1996
		AT 174813 T	15-01-1999
		AU 677780 B2	08-05-1997
		AU 4222393 A	29-11-1993
		AU 680195 B2	24-07-1997
		AU 4222593 A	29-11-1993
		AU 677781 B2	08-05-1997
		AU 4222693 A	29-11-1993
		AU 4222793 A	29-11-1993
		AU 677197 B2	17-04-1997
		AU 4223593 A	29-11-1993
		CA 2134474 A1	11-11-1993
		CA 2134475 A1	11-11-1993
		CA 2134476 A1	11-11-1993
		CA 2134477 A1	11-11-1993
		CA 2134478 A1	11-11-1993
		DE 69303483 D1	08-08-1996
		DE 69303483 T2	06-02-1997
		DE 69303898 D1	05-09-1996
		DE 69303898 T2	20-02-1997
		DE 69312483 D1	04-09-1997
		DE 69312483 T2	12-02-1998
		DE 69319427 D1	06-08-1998
		DE 69319427 T2	10-12-1998
		DE 69322774 D1	04-02-1999
		DE 69322774 T2	17-06-1999
		EP 0637996 A1	15-02-1995
		EP 0637997 A1	15-02-1995
		EP 0639223 A1	22-02-1995
		EP 0637998 A1	15-02-1995
		EP 0637999 A1	15-02-1995
		ES 2106341 T3	01-11-1997
		ES 2127276 T3	16-04-1999
		GR 3025037 T3	30-01-1998
		GR 3029509 T3	28-05-1999
		HK 16897 A	13-02-1997
		HK 1001305 A1	16-11-2001
		JP 3298882 B2	08-07-2002
		JP 7506430 T	13-07-1995
		JP 7506431 T	13-07-1995
		JP 7506256 T	13-07-1995
		JP 3207424 B2	10-09-2001
		JP 7506257 T	13-07-1995
EP 0485228 A	13-05-1992	AT 142790 T	15-09-1996
		AT 176528 T	15-02-1999
		AT 203188 T	15-08-2001
		CA 2055095 A1	10-05-1992
		DE 69122036 D1	17-10-1996
		DE 69122036 T2	06-02-1997
		DE 69130876 D1	18-03-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001029

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0485228 A		DE 69130876 T2	29-07-1999
		DE 69132666 D1	23-08-2001
		DE 69132666 T2	08-05-2002
		DK 485228 T3	30-09-1996
		DK 725276 T3	20-09-1999
		DK 755719 T3	24-09-2001
		EP 0485228 A1	13-05-1992
		EP 0725276 A1	07-08-1996
		EP 0755719 A2	29-01-1997
		ES 2094206 T3	16-01-1997
		ES 2126978 T3	01-04-1999
		ES 2159681 T3	16-10-2001
		GR 91100453 A , B	08-10-1992
		JP 3299768 B2	08-07-2002
		JP 4285858 A	09-10-1992
EP 0849595 A	24-06-1998	EP 0849595 A1	24-06-1998
		AT 201100 T	15-05-2001
		AU 724475 B2	21-09-2000
		AU 4690797 A	25-06-1998
		BR 9705648 A	23-02-1999
		CN 1191312 A , C	26-08-1998
		DE 59606885 D1	13-06-2001
		DK 849595 T3	28-05-2001
		ES 2156610 T3	01-07-2001
		GR 3035882 T3	31-08-2001
		HK 1008244 A1	02-11-2001
		JP 10197534 A	31-07-1998
		NO 975937 A	19-06-1998
		PT 849595 T	31-10-2001
		US 6203706 B1	20-03-2001